

花菜类杂交种纯度鉴定 SSR 核心引物筛选

丁 燕¹ 木万福² 杨 龙² 张 鹏¹ 管俊娇¹

(¹ 云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所,昆明 650205; ² 云南省农业科学院热区生态农业研究所,元谋 651300)

摘要:采用 SSR 分子标记方法对 70 份青花菜及花椰菜杂交种进行 DNA 指纹分析,根据多态性和杂合率 2 个指标,确定一套适于花菜杂交种纯度鉴定的 SSR 核心引物。结果表明,BoGMS0624、OI11G11 和 BoGMS0941 等 3 个 SSR 标记的多态性和杂合率较高,利用这 3 个引物进行鉴定,共有 68 个品种(占 97%)为杂合带型,可作为花菜品种纯度检测的核心引物;此外本研究还筛选出 11 个品种的纯度鉴定特异引物,可以满足快速检测的需求。

关键词:花椰菜;青花菜;SSR 标记;纯度鉴定;核心引物

甘蓝种(*Brassica oleracea* L.)是十字花科芸薹属的二倍体种,起源于欧洲地中海沿岸,由甘蓝野生种经过自然和人工的双重选择形成了不同的栽培类型,如普通甘蓝、羽衣甘蓝、皱叶甘蓝、紫甘蓝、抱子甘蓝、苤蓝、青花菜、花椰菜以及芥蓝等变种^[1]。花椰菜(*B.oleracea* var. *botrytis*)和青花菜(*B.oleracea* var. *Italica*)以其独特的生殖器官花球为商品和食用器官,含有多种维生素、矿物质、粗纤维等,特别是富含莱菔硫烷,具有防癌、抗癌功效。我国是花菜生产大国,也是花菜消费大国。然而,在我国花菜栽培历史中,其生产用种主要依赖于国外进口。目前生产中青花菜用种 90% 以上仍然为进口,种子价格奇高。

种子纯度是评价种子质量的关键,在大面积种植之前快速准确地鉴定种子质量,是非常关键和必要的步骤^[2]。传统的种子纯度鉴定方法是以播种后植株的田间形态观察为依据,其周期长、工作量大,且易受环境、季节因素影响。因此,开发快速、准确的种子纯度鉴定方法已成为种子科研单位和企业急需解决的问题。随着分子标记技术的发展,该技术已经在花菜类品种纯度鉴定中得到应用,具有快速、准确、稳定、安全、不受环境因素影响等优点。其中,SSR 标记具有操作简便和稳定可靠等优点,加之具有大量的等位差异,多态性十分丰富,在杂交种子纯度检测中有广阔的应用前景。然而,在以往的研究中,为解决少数杂交种的纯度鉴定,往往需要进行大量

的引物筛选工作,才能找到适合的鉴定引物^[3]。确定一套适于纯度鉴定的核心引物,并构建品种纯度鉴定体系,对花菜类种子的纯度鉴定至关重要。有了核心引物就不再需要进行繁琐的引物筛选,即使对未知品种,也只需进行少量的筛选,就能迅速找到合适的鉴定引物^[4]。本研究通过对 70 个花椰菜和青花菜材料的 DNA 指纹分析,确定适于花菜类杂交种纯度鉴定的核心引物,构建了花菜类杂交种纯度鉴定体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验材料选取 F₁ 材料 70 份,其中青花菜栽培品种 22 份,花椰菜 47 份,西兰苔 1 份(表 1),2020 年 8 月在云南省农业科学院热区生态农业研究所基地种植,采样后于 -80℃ 保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 全基因组 DNA 提取 以改良 CTAB 法^[5]提取全基因组 DNA,获得的全基因组 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测浓度并保存备用。

1.2.2 SSR 引物 依据前人研究公布的甘蓝类 SSR 标记^[6-8],合成引物 100 对,经过初筛,在每条染色体上选择 1~3 对引物,共选择 22 对引物进行荧光标记,用于遗传多样性检测,引物详细信息见表 2。

1.2.3 标记筛选 采用 22 对荧光引物对 70 个杂交种全基因组 DNA 进行扩增,PCR 总反应体系为 10μL : 5μL 2×mix 混合液、0.3μL 10μmol/L 正向引物、0.3μL 10μmol/L 反向引物,1μL 样品 DNA,3.4μL 超纯水。扩增程序为 94℃ 预变性 5min ; 94℃ 变性 45s,55℃ 退火 45s,72℃ 延伸 1min,循环

基金项目:云南省科技人才和平台计划(2017HB087);云南省科技重大专项(2019ZG001)

通信作者:管俊娇

30 次; 72 ℃ 延伸 10min, 4 ℃ 保存。引物及试剂均由北京擎科生物有限公司提供。扩增产物在毛细

管荧光电泳系统 AB 3730XL DNA 分析仪(Applied Biosystems, USA)上检测。

表 1 70 份供试材料的基本信息

序号	材料名称	变种	来源	序号	材料名称	变种	来源
1	W131	松花菜	云南省农业科学院	36	绿雄 90	青花菜	日本时田种苗株式会社
2	1519	松花菜	云南省农业科学院	37	蝴蝶	青花菜	日本坂田种苗株式会社
3	18115	青花菜	云南省农业科学院	38	浙青 75	青花菜	浙江美之奥种业股份有限公司
4	1518	松花菜	云南省农业科学院	39	祥云 90	松花菜	厦门龙之子农业科技有限公司
5	1808	松花菜	云南省农业科学院	40	时田美青	青花菜	日本时田种苗株式会社
6	C18222	松花菜	云南省农业科学院	41	强汉	青花菜	美国圣尼斯
7	女神	青花菜	武汉亚非种业有限公司	42	雅翠 91	青花菜	先正达
8	C18211	松花菜	云南省农业科学院	43	s100	松花菜	庆农种苗有限公司
9	亚非 75	松花菜	武汉亚非种业有限公司	44	亚松 20004	松花菜	武汉亚非种业有限公司
10	C18225	松花菜	云南省农业科学院	45	亚松 20005	松花菜	武汉亚非种业有限公司
11	C18218	松花菜	云南省农业科学院	46	亚松 20006	松花菜	武汉亚非种业有限公司
12	C18336	松花菜	云南省农业科学院	47	亚松 20007	松花菜	武汉亚非种业有限公司
13	1402	松花菜	云南省农业科学院	48	亚松 20008	松花菜	武汉亚非种业有限公司
14	W133	松花菜	云南省农业科学院	49	亚松 20009	松花菜	武汉亚非种业有限公司
15	喜鹊	青花菜	日本坂田种苗株式会社	50	松 LZZ	松花菜	云南省农业科学院
16	台绿 3 号	青花菜	浙江勿忘农种业股份有限公司	51	松 LZZ2008	松花菜	云南省农业科学院
17	17-2305	青花菜	日本泷井种苗株式会社	52	松 LZZ JB026	松花菜	云南省农业科学院
18	扭扭	青花菜	浙江美之奥种业股份有限公司	53	松 1907	松花菜	云南省农业科学院
19	绿辉 7 号	青花菜	大连米可多国际种苗有限公司	54	松 1942	松花菜	云南省农业科学院
20	冷翠	青花菜	先正达	55	松 2166	松花菜	云南省农业科学院
21	浙青 80	青花菜	浙江美之奥种业股份有限公司	56	松 2169	松花菜	云南省农业科学院
22	耐寒优秀	青花菜	日本坂田种苗株式会社	57	松 LZZ 2046	松花菜	云南省农业科学院
23	强雪	白花	厦门龙之子农业科技有限公司	58	松 LZZ 2090	松花菜	云南省农业科学院
24	庆扬 90	松花菜	庆农种苗有限公司	59	松 LZZ 2076	松花菜	云南省农业科学院
25	亚非 100	松花菜	武汉亚非种业有限公司	60	亚松 19001	松花菜	武汉亚非种业有限公司
26	贝绿美	西兰苔	美国圣尼斯	61	亚松 16001	松花菜	武汉亚非种业有限公司
27	锦翠 2 号	青花菜	先正达	62	亚松 15006	松花菜	武汉亚非种业有限公司
28	亚松 20010	松花菜	武汉亚非种业有限公司	63	松 1947	松花菜	云南省农业科学院
29	亚松 20002	松花菜	武汉亚非种业有限公司	64	松 1821	松花菜	云南省农业科学院
30	亚松 20003	松花菜	武汉亚非种业有限公司	65	松 2170	松花菜	云南省农业科学院
31	翡翠 11 号	青花菜	先正达	66	松 1963	松花菜	云南省农业科学院
32	绿辉 6 号	青花菜	大连米可多国际种苗有限公司	67	松 LZZ JB042	松花菜	云南省农业科学院
33	MKS-1307	青花菜	大连米可多国际种苗有限公司	68	松 LZZ 923	松花菜	云南省农业科学院
34	NHYX	青花菜	日本坂田种苗株式会社	69	松 2167	松花菜	云南省农业科学院
35	三月鲜	青花菜	武汉亚非种业有限公司	70	松 LZZ JB059	松花菜	云南省农业科学院

松花菜和白花为花椰菜的 2 个类型

表 2 22 对 SSR 引物

序号	引物名称	染色体	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
1	HCSSR1	-	TTCTGACACGGTGACACCTC	AGACGATAACCGAGTGGTGG
2	BoSF2564	C9	TTGCTTTTGCTTCTGGGTTT	TGTTTGTGTCCGAAATCACG
3	BoE607	C1	TCTATTCACAACGATTCAACTAAC	CGGTACGGCTGGCTCTT
4	BoE718	C3	CAAGAAACGGACGTGGTGAAAG	TCTCGCGTATGGGGCTGTCT
5	BoE450	C4	TCTCGCCATGGCTGATAAG	TCGGGGCGTTGATTCTCGTCTCT
6	BoE699	C5	TCCCCACCCCCAAAAAGAGA	AACGAGCCATCCGAAGAAGAGG
7	BoE761	C6	CATTCAGCGACTTCCTTCAAACCTT	GGCGCACTTCTTCCCTGTA
8	BoE723	C7	CGTTGAGGCCGAGAGTGAGAG	ATGACGCCGGAATAGAGAA
9	BoE134	C8	CTCTTATTCTTGTAGGGCTTTTA	CCGTTGGAGATGACTGACTG
10	BoE051	C9	GAGTCTTCGCTCTTCTTCTCC	AGTCGCCATTATTAACACCTCTA
11	BoGMS1322	C1	CTCTCCAATCCTTCTTCTCAC	CCACCTTCTCCACTAATAACC
12	BoGMS1119	C2	ACTGGAGTTTCAATTGGATG	CATCATCTTCAGCACTAGCA
13	BoGMS2431	C3	CAACCACCGACTCAAATACAGA	GCACCTGCAATCTCCATACATA
14	BoGMS0501	C4	ATGATGAGTTTGCTCGTTAGG	AAATCCTTCCTCCTTTCAC
15	BoGMS1004	C5	ATGTATCTCAGCAGCCCACAA	CAATCACAACAGACGTACATGC
16	BoGMS0941	C6	GTTGAAGAACTAAGGAGGAAA	GAACGACAGCGAAGAGAG
17	BoGMS1530	C6	TTTGGGCAGGTCATAAATAG	GAGATTAGATTCCCTCACC
18	BoGMS1009	C7	CGAAACCAGGATAAGTCA	CAATGCTTCTGTATGCGTC
19	BoGMS0808	C8	GTCTCCTCCACCATTATCTTT	GACCTCGTCTTTCCTTGA
20	BoGMS0624	C9	AAGACGAAGTCAAGTCAAGGT	CCTATCATCCAGAGTATCCAG
21	OH11G11	-	GTTGCGGCGAAACAGAGAAG	GACTAGGCCGATCAAACCGAG
22	Na10D03	-	ATGATTTCGCTTGAAATGCC	GATGAAACAATAACCTGAGACACAC

- 表示染色体未知

用 GeneMapper Ver.3.7 (Applied Biosystems, USA) 对原始数据进行统计和校正, 读出每个样品各位点的等位变异片段大小数据。由于花菜是二倍体, 以及 SSR 标记的共显性特征, 供试品种在每个引物位点上的基因型用 X/X (纯合)、X/Y (杂合) 记录, 其中 X、Y 为该位点上两个不同的等位变异片段大小, 小片段在前, 大片段在后。无效等位变异的大小记录为 0/0。

评估引物多态性高低的指标用多态性信息含量 (PIC, polymorphism information content), 评估引物位点杂合程度的指标用杂合率^[3]。

1.2.4 分子标记有效性验证 随机选取 2 个花菜杂交组合, 分别提取父母亲本、F₁ 的 DNA, 并用筛选出的纯度检测核心 SSR 分子标记进行检测, 以评价所筛选出的核心 SSR 分子标记的有效性。

2 结果与分析

2.1 纯度鉴定核心引物的筛选 利用 22 对 SSR 引物建立了 70 个花菜类杂交种的 DNA 指纹图谱, 根据图谱数据统计分析引物的基因频率、基因分布信息及多态性和杂合率表现。由表 3 可知, 在这 70 份材料中, 73% 的引物位点的实际基因型数小于理论基因型数。多态性信息含量 (PIC) 的变化范围为 0.05~0.69, 平均为 0.43。根据衡量基因变异程度高低的多态性信息量指标^[9], 当 $PIC \geq 0.50$ 时, 该引物为高度多态性信息引物; 当 $0.25 \leq PIC < 0.50$ 时为中度多态性信息引物; 当 $PIC < 0.25$ 时为低度多态性信息引物。22 对引物中有 9 对高度多态性信息引物, 9 对中度多态性信息引物, 4 对低度多态性信息引物。杂合率的变化范围为 0~0.72, 平均杂合率为 0.36, 表明这些杂交种遗传背景狭窄, 集中在几

个骨干亲本的血缘关系上。

根据王风格等^[3]提出的核心引物的筛选原则,把引物分为3类:第1类为多态性高,且杂合率高的引物,包括 BoGMS0624、BoGMS0941 和 OI11G11;第2类为多态性高或中,且杂合率高或中的引物,如 BoE607、BoE761、BoGMS2431、BoGMS0808 和

BoGMS1530;其余引物归为第3类,多态性低或中,且杂合率低。

70个杂交种中有68个可以用 BoGMS0624、BoGMS0941 和 OI11G11 3个引物找到杂合带型,只有2个品种(W131 和亚松 20003)不具有杂合带型,所以这3个引物可作为花菜纯度鉴定的核心引物。

表3 22对 SSR 引物检测到的遗传多样性信息

引物	等位基因数	理论基因型数	实际基因型数	多态性信息含量	杂合率	最大基因频率
BoE051	3	6	3	0.19	0.22	0.89
BoE450	2	3	3	0.31	0.03	0.74
BoGMS0624	6	21	9	0.64	0.71	0.49
BoGMS1004	5	15	7	0.42	0.13	0.67
BoE607	3	6	6	0.57	0.61	0.42
BoE723	3	6	3	0.38	0.22	0.74
BoGMS1009	5	15	8	0.47	0.21	0.64
BoGMS2431	3	6	6	0.50	0.44	0.60
BoE134	2	3	2	0.21	0	0.86
BoE718	6	21	8	0.54	0.18	0.63
BoGMS0501	5	15	9	0.46	0.47	0.70
BoGMS0808	5	15	9	0.67	0.50	0.44
BoE761	4	10	7	0.62	0.58	0.46
BoGMS1119	3	6	5	0.26	0.21	0.83
BoGMS1530	9	45	13	0.69	0.52	0.39
BoSF2564	4	10	5	0.39	0.44	0.56
BoE699	2	3	2	0.05	0	0.97
BoGMS0941	5	15	7	0.63	0.72	0.47
BoGMS1322	4	10	4	0.22	0.28	0.86
HCSSR1	2	3	3	0.37	0.19	0.54
Na10D03	2	3	3	0.35	0.56	0.67
OI11G11	3	6	6	0.57	0.65	0.42
平均	3.91	11.05	5.82	0.43	0.36	0.64

2.2 花菜纯度鉴定特异引物的确定 表4汇总了引物的最低频率基因型,有22个基因型仅出现一次,其中亚松 20002 有2个位点的基因型仅出现一次,最低频率为0.014(1/70)。根据王风格等^[3]对特异引物的定义,在指定品种范围内,利用某一引物检测,指定品种的杂合基因型表现唯一,或者依据引物的基因频率表,当预测基因型频率低于一定数值时,可将该引物视为该品种的特异引物。在本研究中有21个品种具有特异性引物,但并不是所有

的特异性引物都可为纯度鉴定所用。如松 1963 在 BoGMS0624 位点的基因型 327bp/335bp,在70个品种中仅出现一次,且为杂合基因型,实际基因型频率为0.014,但是其理论基因型频率为0.039,即还有可能出现相同带型的品种,该引物可用于鉴定松 1963 自交苗,但是不能用于异型株的鉴定,也就不能作为松 1963 的特异引物使用。在21个品种中有8个品种的实际基因型频率小于理论基因型频率,这些基因型的引物不能作为纯度鉴定特异引物使用。此外,

雅翠 91 (252bp/252bp)、贝绿美 (254bp/254bp) 和亚松 20003 (368bp/368bp) 3 个基因型为纯合基因型, 这些位点也不适合作为纯度鉴定特异引物。因此,

本研究共筛选出浙青 75、浙青 80、蝴蝶等 11 个品种 (图 4 最后一列加粗品种) 的纯度鉴定特异引物, 可以用于这些品种纯度快速检测。

表 4 具有最低基因型频率的基因型

引物	品种个数	品种名称	最低频率基因型 (bp/bp)	实际基因型频率	理论基因型频率
BoGMS0624	1	松 1963	327/335	0.014	0.039
	1	浙青 75	333/341	0.014	0.002
BoGMS1004	1	浙青 80	247/251	0.014	0.002
	1	蝴蝶	247/253	0.014	0.009
	1	贝绿美	254/254	0.014	0.000169
BoGMS1009	1	1402	245/259	0.014	0.009
	1	蝴蝶	247/259	0.014	0.199
	1	1518	259/263	0.014	0.009
BoGMS2431	1	三月鲜	216/218	0.014	0.097
BoE718	1	台绿 3 号	181/224	0.014	0.00126
BoGMS0501	1	雅翠 91	252/252	0.014	0.023
	1	松 LZZ 2090	256/258	0.014	0.0169
BoGMS0808	1	松 1942	132/150	0.014	0.0347
	1	松 LZZ JB026	139/148	0.014	0.187
BoGMS1530	1	亚非 75	359/362	0.014	0.007
	1	1808	359/368	0.014	0.024
	1	亚松 20002	364/368	0.014	0.001167
	1	亚松 20003	368/368	0.014	0.001733
BoSF2564	1	亚松 20002	215/222	0.014	0.00848
	1	1402	222/234	0.014	0.001733
BoGMS1322	1	台绿 3 号	121/123	0.014	0.013
	1	美青	121/125	0.014	0.013

2.3 花菜纯度鉴定核心引物的有效性验证 采用筛选出的 3 个纯度检测核心 SSR 分子标记对随机选取的 2 个花菜杂交组合 (MS048-1-2 × C18232、MS048-1-2 × C18199) 的父母亲本、F₁ 的 DNA 进行检测。结果显示, 2 个杂交组合都从核心引物中筛选到了互补型条带。如图 1 所示, A 中为杂交组合 MS048-1-2 × C18232 及 F₁ (松 1821) 在 BoGMS0941 引物的扩增条带, a1 为母本 MS048-1-2 (234bp), a2 为父本 C18232 (224bp), a3 为 F₁ 出现了父母本的 2 个互补条带 (224bp/234bp)。B 中为杂交组合 MS048-1-2 × C18199 及 F₁ (松 1963) 在 OH1G11 引物的扩增条带, b1 为母本 MS048-1-2 (129bp), b2 为父本 C18199 (154bp), b3 为 F₁ 出现

了父母本的 2 个互补条带 (129bp/154bp)。

3 结论与讨论

SSR 标记技术可以通过检测待鉴定样品是否具有某一品种的基因特异片段来辨别其真伪, 从而对种子纯度进行检测, 具有快速、准确、稳定、安全、不受环境因素影响等优点。目前, SSR 标记已被广泛应用于水稻、棉花、玉米等作物的杂交种纯度鉴定。本研究中引物的实际基因型数普遍低于理论基因型数, 多态性较低, 平均 PIC 值为 0.43, 杂合率也不高, 平均杂合率为 0.36, 揭示了目前花菜的遗传背景狭窄, 主要集中在几个骨干亲本。这增加了杂交种的区分难度, 也不利于杂交种纯度检测。

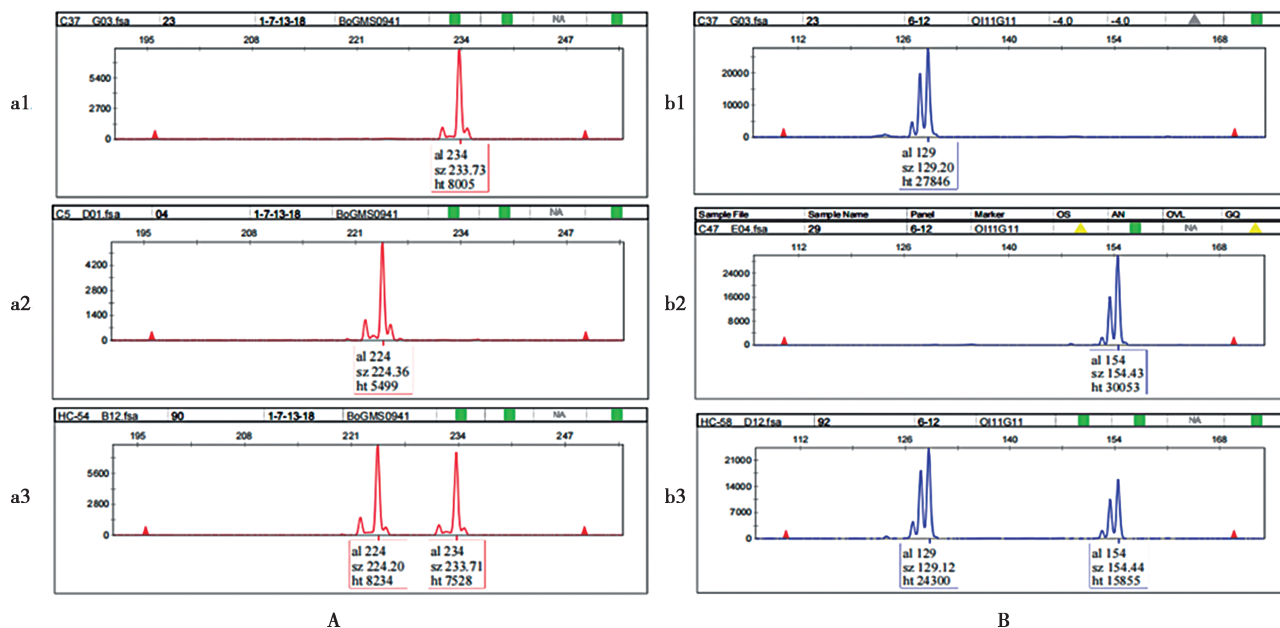


图1 2个杂交组合父母本及 F_1 的毛细管荧光检测电泳图

杂交种纯度鉴定一是检测母本自交、父本误收因素造成的杂交种混杂,二是鉴定由异源花粉污染或机械混杂等造成的异型株。检验自交苗时需1对双亲互补型引物,再利用特异引物或引物组合检验异型株。引物杂合率高,更容易筛选到双亲互补型引物用于检验自交苗;引物多态性高,可降低相同带型出现频率,有利于区分异型株。本试验筛选出了3个共显性SSR标记BoGMS0624、BoGMS0941和OI11G11,作为花菜品种纯度检测的核心引物。这3个引物杂合率高,97%的品种均可以找到具有杂合带型的引物,满足检验自交苗的需要,且这3个引物多态性高,具有较高的验杂能力。因此,这3个引物可以推荐作为纯度鉴定的首选核心引物。其他5个中等表现的引物BoE607、BoE761、BoGMS2431、BoGMS0808和BoGMS1530可作为纯度鉴定的备选引物,补充解决上述3个引物不能鉴定的品种。目前已有的研究多是针对特定品种的纯度鉴定引物筛选^[10],从核心引物中选择合适的引物用于特定品种的纯度鉴定,极大地缩减了工作量,提高了检测效率,降低了检测成本。此外,本研究共筛选出浙青75、浙青80、蝴蝶等11个品种的纯度鉴定特异引物,不仅可鉴别自交株,还可鉴别异形株,大大加快了纯度检测速度。

参考文献

- [1] 盛小光,赵振卿,王建升,虞慧芳,沈钰森,王宣怀,顾宏辉.基于SSR标记的花椰菜和青花菜遗传多样性分析.植物遗传资源学报,2019,20(4):949-959
- [2] 赵振卿,盛小光,虞慧芳,王建升,张晓辉,顾宏辉.花椰菜新品种浙801杂交种纯度的SSR鉴定.长江蔬菜,2011(18):18-20
- [3] 王风格,赵久然,王璐,易红梅,郭景伦,戴景瑞,原亚萍,卢柏山,杨国航.适于玉米杂交种纯度鉴定的SSR核心引物的确定.农业生物技术学报,2007,15(6):964-969
- [4] 管俊娇,张建华,张惠,马芙蓉,杨晓洪,王江民.辣椒杂交种纯度鉴定的SSR核心引物筛选.生物技术通报,2014(9):97-101
- [5] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15: 8-15
- [6] 褚云霞,邓姗,李寿国,刘丹,陈海荣,任丽,章毅颖,赵洪.花菜类SSR分子标记筛选及其在品种鉴定上的应用.分子植物育种, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20201113.1321.004.html>
- [7] 刘春晴,李光庆,姚雪琴,蔡杰,谢祝捷.基于SSR标记的花菜类种质亲缘关系和群体遗传结构分析.分子植物育种,2018,16(4):1327-1337
- [8] 张志仙,何道根,朱长志,檀国印,高旭.青花菜种质资源遗传多样性的SSR分析.浙江农业学报,2017,29(2):228-235
- [9] 郭宁,高怀杰,韩硕,宗梅,王桂香,张月云,刘凡.观赏羽衣甘蓝SSR标记分型与亲缘关系研究.植物遗传资源学报,2017,18(2):349-357
- [10] 江汉民,文正华,刘莉莉,单晓政,孙德岭.SSR分子标记鉴定青花菜杂交种‘津青一号’的纯度.天津农业科学,2016,22(12):57-59,63

(收稿日期:2021-08-20)